

多维液相色谱仪的研制与开发

梁振¹ 张丽华¹ 李彤² 张玉奎¹

(¹中国科学院大连化学物理研究所,分离分析化学重点实验室 大连 116023)

(²大连依利特分析仪器有限公司 大连 116023)

E-mail: liangzhen@dicp.ac.cn

摘要 大连化学物理研究所及其合作单位承担了多维液相色谱仪器研制与开发任务。研制了包括高压色谱恒流泵、紫外检测器、多维接口以及一体化控制软件的多维液相色谱仪,整个系统最高工作压力可达到40MPa,泵流量范围可以从1 μ L/min到9.999 mL/min;检测器可以在190~720 nm的波长范围内进行检测。将多维液相色谱仪应用于珠蛋白酶解产物的分析,离子交换色谱作为第一维,反相色谱作为第二维,整个系统的峰容量可以达到3306。

关键词 多维液相色谱仪;接口;蛋白质

中图分类号 TH833

Development of Multi-dimensional Liquid Chromatography Instrumentation

Liang Zhen¹, Zhang Lihua¹, Li Tong², Zhang Yukui¹

(¹Key Lab of Separation Science of Analytical Chemistry, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

(China; ²Dalian Elite Analytical Instruments Co., Ltd., Dalian 116023, China)

Abstract Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences and its cooperation units took on the task of developing multi-dimensional liquid chromatography instrumentation. After several years' endeavor, high pressure constant-flow-rate pump, UV detector, multi-dimensional interfaces and integrated controlling software have been successfully developed. In this paper, the performance of the multi-dimensional liquid chromatography instrumentation was introduced in detail. The maximum operational pressure of the whole system was up to 40 MPa, the range of the flow rate was 1 μ L/min-9.999 mL/min and the wavelength of UV detector was 190~720 nm. Finally, the performance of the multi-dimensional liquid chromatography instrumentation was demonstrated by the analysis of the digests of globin. The first dimension was ion exchange chromatography; the second dimension was reverse phase liquid chromatography. The peak capacity of the whole system was 3306.

Key words Multi-dimensional liquid chromatography instrumentation; Interface; Proteins

液相色谱技术是当今世界发展最活跃,也是发展最快的分析分离技术之一。在化工、医药、环保以及生化等诸多领域发挥着越来越重要的作用。随着科学的发展,样品的复杂性程度越来越大,单独的液相色谱技术(即一维色谱)的分离能力已经不足以满足各领域日益增加的分离需求,需要色谱技术自身有更多的突破。

目前解决复杂体系分离分析问题最新的手段是多维液相色谱方法,即将样品在第一根液相色谱柱的洗脱液依次注入后续的色谱柱进行分离的液相色谱柱联用技术。这种技术根据样品组分的性质差别,可以选择具有最大分离效果的两种色谱分离模式组合,采用相应的第一维和第二维色谱柱(反相柱、离子交

换柱、分子排阻凝胶柱或者亲和色谱柱)进行分离。

大连化学物理研究所及其合作单位在国家科技部支持下,经过九五、十五科技攻关项目的大力投入,在高效液相色谱仪器的研究与开发方面取得了长足的进展,积累了足够的经验。十五攻关研究与开发的多维液相色谱仪,能够应用蛋白质组学、代谢组学以及中药等复杂样品体系的分离分析研究。在接口系统、控制系统、切换系统、数据采集处理等方面取得了长足的进步,取得了一批具有自主知识产权的成果。相当一部分单元产品的性能指标达到目前世界主要品牌的指标,已形成批量生产规模,并远销新加坡、韩国、非洲等地,对推动我国分析仪器的发展,促进相关行业的工作具有非常重要的意义。

收稿日期:2008-07-15

基金项目:国家科技支撑计划项目(2006BAK03A07)。

作者简介:梁振,男,博士,副研究员;通讯作者:张丽华,女,博士生导师,研究员。

1 相关部件的研制

1.1 输液泵的研制

高压恒流泵作为二维系统的输液单元,是系统稳定的关键因素。经过十五项目的研制,成功研制了P230 高压恒流泵。P230 泵最高工作压力可达到 40 MPa,流量范围可以从 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 到 9.999 mL/min ;流量准确度为 $<0.3\%$;流量稳定性 RSD 小于 0.5% 。



图1 P230 高压恒流泵外观

P230 泵基于小凸轮驱动短行程(2 mm)设计的串联式双柱塞往复恒流泵,每次输液体积降低至 15.8 μL ,有效减少了输液脉动,并取消了传统液相色谱输液泵中的缓冲器,降低了泵系统死体积;高集成度的 AT89C55 微控制器及 SPI 总线技术电路设计,通过细分控制技术保证了步进电机在低速下运行的稳定性和重复性,极大提高了低流速下输液的稳定性和准确性,保证了高压梯度系统在宽比例范围流动相组成的稳定性,实现了色谱分析结果的高度准确性和重复性;压力实时反馈流速补偿、程序设置流动相压缩系数和流速准确性校正等功能,保证了极高的流量准确度;通过 RS232 通讯接口进行色谱工作站外部控制高精度二元高压梯度系统,同时能够实现流动相流速梯度;实时压力检测显示、高压限、低压限报警功能保证了仪器运行的安全性;P230 型高压恒流泵精选高质量柱塞杆和密封圈等关键部件,保证了长期运行输液稳定性和耐用性;同时采用了浮动式导向柱塞杆安装方式和卡口式泵头构造,使泵头装卸容易,便于维护保养和更换部件。

1.2 紫外检测系统

UV230⁺ 紫外-可见检测器(图2)由光路部分、控制电路部分和数据处理软件部分组成,采用全封闭光路结构和光纤传导技术替代传统的紫外检测器的光学系统,稳定性好、分辨率高的数据采集处理系统,使得检测器具有稳定性好、灵敏度高优点,波长范围

为 190 ~ 720 nm;波长准确性为 $\pm 0.5\text{ nm}$;波长重复性为 $\pm 0.1\text{ nm}$;基线噪声 $\leq \pm 1.0 \times 10^{-5}\text{ AU}$;基线漂移 $\leq 3 \times 10^{-4}\text{ AU}/\text{h}$ 。



图2 UV230⁺ 紫外-可见检测器

传统的紫外-可见检测器光学系统采用双光路凹面全息光栅单色仪、机械装置调节波长,结构比较复杂,在进行波长选择和调节的过程中易导致波长准确性和重复性变化,增加了检测的不确定性。与传统的紫外检测器不同,二极管阵列检测器的光学系统是由光源发出的光聚焦后首先通过检测池,然后由分光光栅进行分光,最后由光检测元件进行检测。UV230⁺ 紫外-可见检测器采用了二极管阵列检测器的光路系统,检测过程中调节和改变波长无需任何机械装置,极大地提高了波长的准确性和稳定性;新型的电子和光学设计、组合型氙灯和钨灯光源,使 UV230⁺ 检测器在 190 - 720nm 范围内具有很高的灵敏度和可靠性。

1.3 接口研制

多维液相色谱技术的核心之一是将第一维洗脱的样品组分有效地导入第二维中,因此切换接口是整个系统的关键。常用于切割转移样品的接口有以下几种,如样品环交替储存转移样品、平行柱交替富集分析样品、捕集柱富集样品以及无接口的整体两相式色谱柱等。

针对不同的二维系统,需选择合适的切换接口形式。为了达到更好的切换与分离效果,不同的切换技术也可以组合使用。在不同的接口形式中,通常样品的切换由切换阀完成,包括手动及自动切换阀,根据流通情况一般有四通、六通、八通、十通、十二通等。其中全二维液相色谱系统的接口切换阀通常由 2 个四通或 2 个六通、1 个八通、1 个十通、1 个十二通构成。

在项目研究过程中,中科院大连化学物理研究所及其合作单位设计发展了多种接口技术,包括定量环接口、平行柱交替富集分析形式接口、捕集柱接口、阀

切换两相式接口(各种接口可方便的互换)等,构建了 SCX/RP、WAX/RP、GFC/RP、NP/RP 等多种模式的二维液相色谱系统。

1.4 一体化控制

二维液相色谱系统涉及使用的输液泵、检测器、工作站、色谱柱等较多的工作单元,系统相对复杂。因此,一套有效的、设计合理的控制系统也一直是限制二维液相色谱系统发展的障碍。

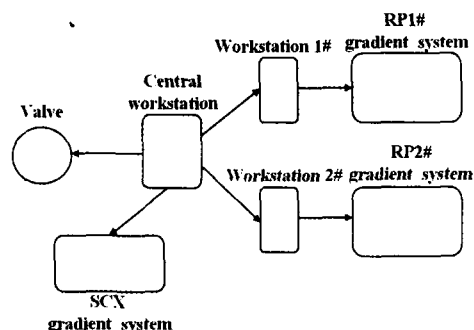


图3 工作站控制流程图

通过“十五”的攻关研究,中国科学院大连化学物理研究所及其合作单位很好地解决了这一问题。设计开发了1套独特的控制软件,采用1台普通电脑,同时控制3套精密二元高压梯度,如图3。通过一套主工作站(第一维工作站)控制两套子工作站(第二维工作站)的方式,使系统配套性更趋完善。专用的十通阀控制软件,可以任意设定切换时间及切换位置,使得一维样品的切割更加方便。工作站软件和硬件的特殊设计,使得整套分析完全达到程序化的要求。

2 SCX/RP 多维液相色谱用于珠蛋白酶解产物分析

2.1 基本实验条件

将加入抗凝剂的新鲜猪血经离心分离后得到红细胞,加入等体积的水溶解红细胞,溶血后的血红蛋白溶液离心 15 min,去弃沉淀,采用酸性丙酮法制取珠蛋白。珠蛋白悬浮于水中,用 HCl 调节溶液的 pH 值至 2.0,然后加水使最终的蛋白浓度为 3%。加入胃蛋白酶在 pH 2.0 的溶液中恒温(37℃) 24 h,反应结束后,升温至 98℃ 灭活,然后离心 10 min,除去沉淀,冷冻干燥以备实验之用。实验中进行一维分析时样品浓度为 10mg/mL,二维分析时进样浓度为 50mg/mL。

2.2 第一维分离系统的构建

第一维强阳离子交换色谱采用填充 Hyperil SCX 的常规柱尺寸色谱柱 100mm × 4.6mm I. D.,样品经

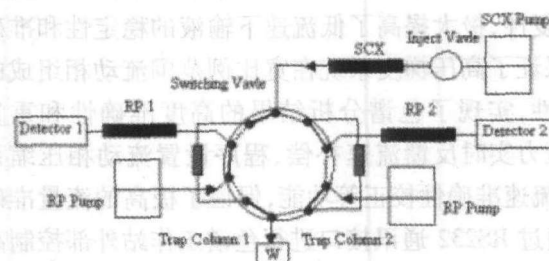
Rheodyne 7725i 进样阀由 P200 II 高压梯度液相色谱泵以 1 mL/min 的流速洗脱。流动相 A 为 5mM NaH₂PO₄ + 1% 乙腈, B 为 A + 1.0mol/L NH₄Cl,流动相 pH 4.0,采用 Delta 320 精密酸度计(Mettler Toledoinstruments)调节 pH。

2.3 第二维分离系统的构建

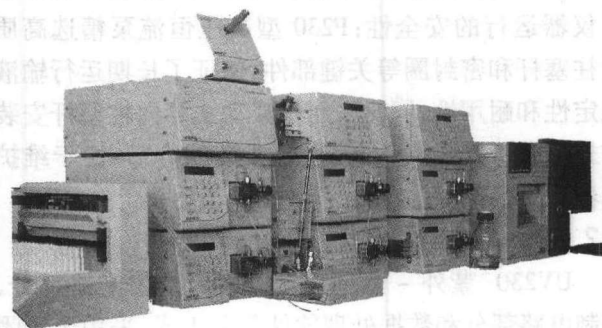
第二维采用两支相同的 Hypersil BDS C18 常规反相色谱柱(250 mm × 4.6 mm I. D.),流动相 A 为含 0.1% TFA 的水溶液, B 为含 0.1% TFA 的乙腈。流动相经在线脱气机脱气处理后由四元梯度泵以 1mL/min 的流速洗脱。在 215 nm 由紫外可变波长检测器检测。捕集柱为 Hypersil BDS C18 色谱柱,接口采用十通 2 位切换阀。所有流动相配制后均经过超声处理。

2.4 2D SCX/RP 系统的构建

本项目构建的二维液相色谱系统如图 4 所示。样品进入阳离子交换色谱,由 SCX 流动相逐步增加盐浓度间断洗脱,通过接口的有效转移将 SCX 洗脱的产物导入第二维反相色谱进一步分离。其中接口采用一个带两支捕集柱的十通 2 位切换阀,在图 4 中的虚线位(2 位)时,SCX 洗脱组份在其中一支捕集柱(Trap2)富集,而另一支捕集柱(Trap1)内富集的组份正由反相柱(RP1)分析,当分析完成时,切换十通阀到实线位(1 位),SCX 洗脱组份富集在捕集柱 Trap1,而 Trap2 内富集的组份由另一支反相柱(RP2)分析。



(a) 在线平行反相二维液相色谱系统流程及接口示意图



(b) 实物图

图4 二维液相色谱系统

第二维反相色谱的总分析时间是 100min, 包含 5min 的脱盐时间, 45min 的梯度分析时间, 25min 的柱清洗时间及 25min 的柱平衡时间。100min 内有效的分析时间只有 45min, 为了提高系统使用效率及减小整个二维系统的总分析时间, 第二维采用两支相同的反相色谱柱进行平行分析。十通阀在 1 位时(图 4 中实线位), RP2 进行分析, 50min 后分析完成, 切换十通阀到 2 位(图 4 中虚线位), RP2 继续由反相流动相清洗柱中残余的保留作用较强的样品组份, 之后由起始浓度流动相平衡色谱柱 25min, 而与此同时 RP1 也由另一套反相流动相开始脱盐及进行梯度分析, 50min 完成分析后, 再切换十通阀到 1 位, RP2 进行脱盐及分析, RP1 进行柱清洗及平衡, 如此循环。由于 SCX 洗脱、捕集柱富集的时间较短, 因此可以在反相色谱柱平衡的间隙内进行。在 25min 的反相色谱柱平衡中, 从 18min 开始启动第一维泵进行 SCX 洗脱并将样品组份富集在捕集柱, SCX 洗脱、捕集柱富集完成后切换十通阀进行反相分析。每次逐步增加盐浓度分 19 次将 SCX 洗脱的样品组份依次转入第二维继续分析。SCX 洗脱的样品组份交替富集在两支捕集柱中, 并由两支反相柱交替分析。样品中等电点(PI)较小的组份(如 $pI < 4.0$)在 SCX 中不保留, 用 0% B(不含 NH_4Cl) 等度洗脱 7min 并富集在 Trap2 中, 富集完成后切换十通阀由 RP2 进行分析, 同时系统开始计时, 之后采用 17 步逐步增加盐浓度的线性梯度方式依次洗脱, 即 0-2B%、2-5B%、5-15B%、15-20B%、20-30B%、30-40B%、40-50B%、50-55B%、55-60B%、60-65B%、65-70B%、70-75B%、75-80B%、80-85B%、85-90B%、90-95B%、95-100B% 各洗脱 7min, 为了彻底清洗 SCX 中保留作用较强的样品组份, 最后一步采用 100B% 洗脱 20min。在 SCX 的 19 次洗脱切割部分中, RP2 交替分析其中 10 个部分, 而 RP1 交替分析其中 10 个部分。

2.5 二维液相色谱分析珠蛋白酶解产物

在选定实验条件下的二维分析结果如图 5 所示。在离子交换色谱和反相色谱构成的二维液相色谱系统中, 因离子交换色谱较高的柱容量通常作第一维系

统, 而反相色谱与离子交换色谱流动相有较好的兼容性 & 较高的分辨率常作第二维系统。

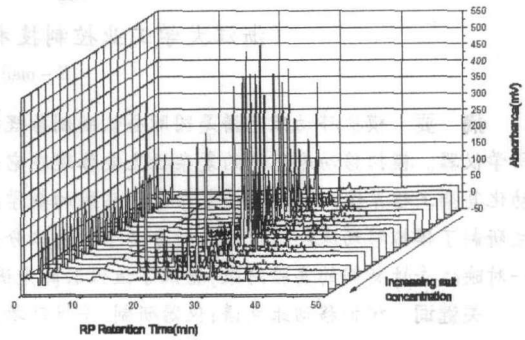


图 5 SCX/RP 高通量分析珠蛋白酶解产物

SCX 色谱柱: Hypersil SCX, $5\mu\text{m}$, $100\text{mm} \times 4.6\text{mmI. D.}$; 流动相 A: $5\text{mM NaH}_2\text{PO}_4 + 1\%$ 乙腈, $\text{pH}4.0$, B: A + $1.0\text{mol/L NH}_4\text{Cl}$, $\text{pH}4.0$; 19 步台阶梯度洗脱; 流速: 1.0mL/min ; 捕集柱: Hypersil BDS C18, $5\mu\text{m}$, $15\text{mm} \times 4.6\text{mmI. D.}$; RP 色谱柱: Hypersil BDS C18, $5\mu\text{m}$, $250\text{mm} \times 4.6\text{mmI. D.}$; 流动相, A: 含 0.1% TFA 的水, B: 含 0.1% TFA 的乙腈; 梯度条件: 1-1-5-45-100-100-1-1B% (0-4.9-5-50-60-75-75.1-100min); 流速: 1.0mL/min ; 检测: 214nm 。

由于 SCX 对样品的切割分离, 二维分离的结果大大降低了样品分析的复杂性。同时由于二维分离机理的正交性, 进一步拓宽了样品的分离空间, 增强了系统的分离能力。在分析珠蛋白酶解产物中, 第一维离子交换切割次数为 19 次; 由图 5 可知第二维反相色谱峰容量为 174; 这种台阶式洗脱切割方法峰容量为第一维切割次数乘以第二维峰容量, 因此研制的 SCX/RP 二维液相色谱的峰容量可以达到 3306。

3 结论

经过“十五”攻关项目的研制, 大连化学物理研究所及其合作单位成功研制了多维液相色谱仪, 包括高压色谱泵、检测器以及接口的研制。仪器的峰容量能够达到 3000 以上, 由于第二维采用反相色谱, 使用的流动相与质谱匹配, 因此研制的多维液相色谱仪可以方便的与质谱在线联用。能够应用于蛋白质组学、代谢组学以及中药等研究领域研究。